

DialogWeb

Guided Search new search favorites settings order cost logoff help

Dynamic Search: INPADOC/Family and Legal Status, Derwent World Patents Index®

Records for: **PN=JP 11018798**

save as alert... save strategy only...

Output  Format: **Long** Output as: **Browser** display / send

Modify  refine search back to picklist

select
all none

Records 1-2 of 2 In long Format

☐ 1. **3/34/1 (Item 1 from file: 345)**

14970986

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 11018798 A2 990126 No. of Patents: 001

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 11018798 A2 990126

DETERMINATION OF CHOLESTEROL AND REAGENT THEREFOR (English)

Patent Assignee: INT REAGENTS CORP

Author (Inventor): SHIRAHASE YASUSHI; KISHI KOJI; TOTSU YOSHIFUMI

Priority (No,Kind,Date): JP 97181297 A 970707

Applic (No,Kind,Date): JP 97181297 A 970707

IPC: * C12Q-001/60; C12Q-001/26; C12Q-001/32; G01N-033/92

CA Abstract No: * 130(09)107247R; 130(09)107247R

Derwent WPI Acc No: * C 99-169901; C 99-169901

Language of Document: Japanese

Inpadoc/Fam.& Legal Stat (Dialog® File 345): (c) 2005 EPO. All rights reserved.

☐ 2. **3/34/2 (Item 1 from file: 351)**

012363794

WPI Acc No: 1999-169901/ 199915

Estimating cholesterol for foodstuff inspection - comprises measuring hydrogen peroxide released due to cholesterol oxidase obtained during reduction reaction of secondary dehydrogenase

Patent Assignee: KOKUSAI SHIYAKU KK (KOKU-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11018798	A	19990126	JP 97181297	A	19970707	199915 B

Priority Applications (No Type Date): JP 97181297 A 19970707

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 11018798	A	J	7	C12Q-001/60	

Abstract (Basic): JP 11018798 A

NOVELTY - The reduction reaction of secondary dehydrogenase in the presence of reduction coenzyme is performed to obtain the cholesterol oxidase. The cholesterol in the presence of oxidation coenzyme is converted into hydrogen peroxide by the cholesterol oxidase. The amount of hydrogen peroxide liberated is measured.

USE - The method is useful for clinical and physical examinations

in the case of diseases e.g. atherosclerosis, geriatric diseases and also useful for food stuffs, reagent inspection.

ADVANTAGE - The method is able to detect and quantify cholesterol even in small amounts.

Dwg.0/4



Derwent Class: B04; D13; D16; S03

International Patent Class (Main): C12Q-001/60

International Patent Class (Additional): C12Q-001/26; C12Q-001/32;

G01N-033/92

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input type="button" value="select"/>	Records 1-2 of 2 In long Format	
<input type="button" value="all none"/>		
Output 	Format: <input type="text" value="Long"/>	Output as: <input type="text" value="Browser"/>
Modify 		<input type="button" value="display/send"/>
		<input type="button" value="refine search"/> <input type="button" value="back to picklist"/>

©1997-2005 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-18798

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月26日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/60		C 1 2 Q 1/60
1/26		1/26
1/32		1/32
G 0 1 N 33/92		G 0 1 N 33/92 A

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-181297

(22) 出願日 平成9年(1997) 7月7日

(71) 出願人 000170565
国際試薬株式会社
兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72) 発明者 白波瀬 泰史
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 岸 浩司
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72) 発明者 渡津 吉史
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(74) 代理人 弁理士 高島 一

(54) 【発明の名称】 コレステロールの定量方法及び定量用試薬

(57) 【要約】

【解決手段】 コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、還元型補酵素、該コレステロールデヒドロゲナーゼにより変換される酸化型補酵素を還元型補酵素に再生する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質の存在下、コレステロールを基質としてサイクリング反応させる。これにより生じる過酸化水素の生成量を測定してコレステロールを定量する。

【効果】 検体中に存在するコレステロール量自体が微量な場合、または検体量自体がごく少量の場合であっても、コレステロールを正確に定量できるようになり、臨床検査や食品検査の分野での有用性が高い。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、還元型補酵素、該コレステロールデヒドロゲナーゼにより変換される酸化型補酵素を還元型補酵素に再生する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質の存在下、コレステロールを基質としてサイクリング反応させることにより生じる過酸化水素の生成量を測定することを特徴とするコレステロールの定量方法。

【請求項2】 還元型補酵素が、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソニウム還元型、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソニウム還元型又はチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソニウム還元型である請求項1記載の定量方法。

【請求項3】 第二のデヒドロゲナーゼが、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ又はホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼである請求項1記載の定量方法。

【請求項4】 コレステロールオキシダーゼ、コレステロールデヒドロゲナーゼ、還元型補酵素、該コレステロールデヒドロゲナーゼにより変換される酸化型補酵素を還元型補酵素に再生する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質を含有するコレステロールの定量用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、主として臨床検査や食品検査の分野での使用を目的とする微量のコレステロールの定量方法及び定量用試薬に関する。

【0002】

【発明の背景】コレステロールは、日常の臨床や健康診断などで良く知られている検査対象であり、一般に動脈硬化の危険因子と言われている。このような成人病に対する総コレステロールの測定以外に、血清のリポ蛋白の分画であるHDL（高比重リポ蛋白）やLDL（低比重リポ蛋白）中のコレステロールも測定されている。最近ではレムナント様リポ蛋白分画中のコレステロールも注目されているが、コレステロール濃度が低いために感度良く測定される方法が要望されていた。また、血球などの細胞内の微量コレステロールについての研究も行われている。

【0003】一方、高コレステロールの人に対する食事療法の重要性が指摘されている。日常生活で摂取する食品中のコレステロールについて、以前よりもより正確な測定が要求されはじめた。特に、バター、牛乳、卵の無コレステロール化が進められている現在、より高感度のコレステロール測定方法が要求されてきている。

【0004】

【従来の技術】コレステロールを高感度に測定する方法としては、ガスクロマトグラフィー法、コレステロール

オキシダーゼを作用させて生じる過酸化水素を蛍光・発光で測定する方法、コレステロールデヒドロゲナーゼ（CDH）で生じるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型（NADH）を蛍光・発光で測定する方法などがある。

【0005】しかし、これらの方法は有機溶媒による抽出操作が煩雑であったり、大量に試料が必要であったり、血清などでは内因性物質の干渉が大きく使用できないなどの欠点があった。

【0006】本発明者らは、先に酸化型補酵素、還元型補酵素及びCDHを組み合わせたサイクリング反応による高感度測定方法（特開平8-70894号公報）を開発し、この方法による微量コレステロールの測定を可能にした。この方法によれば、検体の前処理をすることなく、迅速に感度・特異性に優れたコレステロールの高感度定量が可能である。

【0007】しかしながら、第二のデヒドロゲナーゼがNAD（P）に作用して試薬ブランクが上昇する場合には、第二のデヒドロゲナーゼを添加しないで還元型補酵素を大量に添加することで対処している。そのような条件では、測定中経時的に還元型補酵素が減少して酸化型補酵素が増加するので、サイクリング率が低下して反応が直線的に進行しないため、初速度（レート測定）で測定する必要がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上述のような従来の方法を改良して、極微量のコレステロールから血清などの高濃度のコレステロールまでの広範囲の濃度域のコレステロールを定量できる方法及びそのための試薬を提供することにより、とりわけ臨床検査や食品検査の分野に貢献することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、特開平8-70894号公報に示す方法を継続して検討している最中、別のコレステロールの高感度測定方法があることを見出した。即ち、コレステロールオキシダーゼ、還元型補酵素、CDH、該CDHにより変換される酸化型補酵素を還元型補酵素に再生する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質を組み合わせることにより、上記問題が解決できることを見出し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

【0010】本発明のコレステロールの定量方法は、コレステロールオキシダーゼ、CDH、還元型補酵素、該CDHにより変換される酸化型補酵素を還元型補酵素に再生する第二のデヒドロゲナーゼ及び該第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質の存在下、コレステロールを基質としてサイクリング反応させることにより生じる過酸化水素の生成量を測定することを特徴とするものであり、特に該第二のデヒドロゲナーゼ及びその還元型基質を組み合わせることに特徴がある。還元型補酵素、CDH及

3

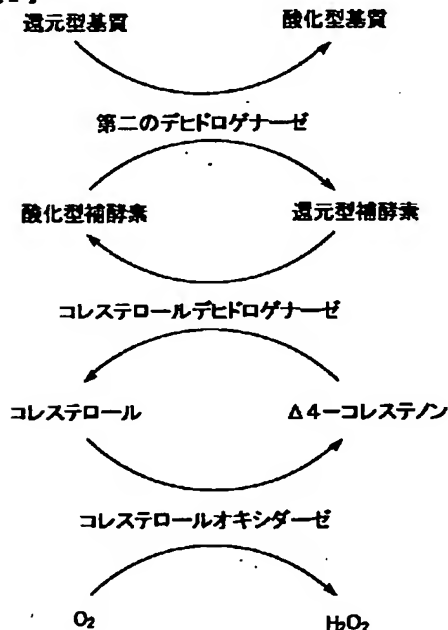
びコレステロールオキシダーゼを組み合わせただけでは高感度化が困難である。即ち、還元型補酵素から酸化型補酵素に変換されることにより、コレステロールはCDH及びコレステロールオキシダーゼの共通の基質になるので、サイクリング反応による高感度化が達成されないと考えられた。

【0011】本発明者らは、変換された酸化型補酵素を直ちに還元型補酵素に再生することにより、CDHによるコレステロールへの作用性を減じ、コレステロールオキシダーゼ反応を促進できることに想到した。還元型補酵素への変換方法として第二のデヒドロゲナーゼと第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質を添加することにより目的を達成することができた。

【0012】以下に反応式を示す。

【0013】

【化1】



【0014】本発明方法における、デヒドロゲナーゼとオキシダーゼとを組み合わせた基質サイクリング反応自体は公知である。しかしながら、デヒドロゲナーゼが優位に還元型基質（コレステロール）に作用し易い場合には十分な感度を得ることができないので、サイクリング反応による高感度化は行われていなかった。本発明方法においては、酸化型補酵素に優位に反応する第二のデヒドロゲナーゼと、第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質とを添加することにより、酸化型補酵素が還元型補酵素に直ちに再生されるので、コレステロールに対するCDHの反応を遅くする、あるいは停止させることができる。これにより、コレステロールをコレステロールオキシダーゼに作用させやすくすることができるので、効率良く過酸化水素を生成させることができるようになり、高感度化が可能となる。

4

【0015】また、特開平8-70894号公報に記載の方法の場合、第二のデヒドロゲナーゼを添加して、還元型補酵素量を下げようとすると、添加している酸化型補酵素に作用して試薬ブランクの上昇を引き起こす場合があるが、本発明方法では添加する補酵素が一種であり、過酸化水素の生成量を測定するので、第二のデヒドロゲナーゼのマイナス要因はない。それ故、長時間直線的に反応させることができるので、レート分析だけではなく一定時間経過後の吸光度変化量としてのエンドポイント分析も可能であり、定量性の高い高感度測定が可能となる。

【0016】本発明において用いられるコレステロールオキシダーゼとしては、コレステロールを酸化してΔ4-コレステノンと過酸化水素とを生成する酵素であれば何れの酵素でも使用することができる。例えば、シュードモナス由来、ストレプトマイセス由来やノカルディア由来のコレステロールオキシダーゼなどが挙げられる。

【0017】CDHとしては、還元型補酵素の存在下、Δ4-コレステノンをコレステロールに変換する酵素であれば何れの酵素も使用できる。例えば、ノカルディア由来のCDHなどが挙げられる。

【0018】還元型補酵素としては、CDH及び第二のデヒドロゲナーゼが補酵素にするNADアナログなら何れの補酵素でも使用できるが、好ましくはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型（NADH）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸還元型（NADPH）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型（チオNADH）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸還元型（チオNADPH）などが選択される。

【0019】第二のデヒドロゲナーゼとしては、還元型基質の存在下、酸化型補酵素を還元型補酵素に再生するものなら何れの酵素も使用できるが、CDHのような可逆反応を行う酵素を使用すると、直線性、感度などの低下が起こるおそれがあるので、不可逆性の酵素を添加する方が好ましく、例えばグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

【0020】第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質としては、用いるデヒドロゲナーゼが作用するものが選択され、例えば第二のデヒドロゲナーゼがグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼである場合には、グルコース-6-リン酸が用いられ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼである場合には、ホルムアルデヒドが用いられる。

【0021】本発明方法に使用するコレステロールオキシダーゼの必要量は0.1~30U/mL、好ましくは0.5~5U/mLである。CDHの必要量は0.2~50U/mL、好ましくは1~10U/mLである。測定したいコレステロール濃度が低い場合には酵素量を増やし、多いときは酵素量を下げて感度調整することがで

5

きる。第二のデヒドロゲナーゼの必要量は0.1~20 U/mL、好ましくは0.3~10 U/mLである。

【0022】第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質は、測定されるコレステロール濃度、サイクリング反応時間などによって随時適量を添加すれば良いが、通常0.5~5 mM添加すれば良い。還元型補酵素の量は100 μM以下であれば良いが、好ましくは5~50 μM添加する。

【0023】上記の試薬の存在下、コレステロールを基質としてサイクリング反応が進行して過酸化水素が生成する。過酸化水素の定量は、過酸化水素電極、パーオキシダーゼ(POD)やカタラーゼなどを用いて行うことができる。PODを使用する場合には、4-アミノアンチピリンとカラーカプラーとの酸化縮合による色素を測定する方法、蛍光基質を用いてより高感度に測定する方法があるが、血清干渉などを考慮すれば色素定量の方が安心して採用できる。カタラーゼを使用する場合には、メタノール共存下、生成するホルムアルデヒドを公知の方法で測定することができる。

【0024】本発明方法において対象となる検体は、血清、リポ蛋白の分画、髄液、尿、唾液などの体液及び血球、細胞などの臨床検査に応用され得るものだけでなく、食品も含まれる。本発明方法によれば、かかる検体中の微量なコレステロールを精度良く定量することが可能となり、例えば血清のHDL分画中のコレステロールでは50 mg/dL以下、血清のレムナント様リポ蛋白分画中のコレステロールでは10 mg/dL以下、尿中*

緩衝剤	50	mmol/L
β-NADH	X	μmol/L
グルコース-6-リン酸二ナトリウム	3	mmol/L
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	3	U/mL
コレステロールオキシダーゼ	2	U/mL
CDH	4	U/mL
トリトンX-100	0.3%	
4-アミノアンチピリン	1	mmol/L
TOOS	1.5	mmol/L
POD	3	U/mL
pH	7.5	

TOOS: N-メチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-3-メチルアニリン

【0030】β-NADHの濃度(X)が15.6、31.3、62.5、125、250 μMの各試薬を調製した。これらの試薬400 μLに0、1、2、4、8、16、32、64 mg/dLのコレステロール水溶液(10%トリトンX含有)各々を検体として10 μL添加し、37℃で5分間反応後の吸光度を波長546 nmで測定した。コレステロール濃度に対して吸光度をプロットした結果を図1に示す。

6

*のコレステロールでは5 mg/dL以下の精度で定量することが要求されているが、本発明方法はかかる要求に応えることができる。

【0025】本発明のコレステロールの定量用試薬は、上述のコレステロールオキシダーゼ、CDH、還元型補酵素、第二のデヒドロゲナーゼ及び第二のデヒドロゲナーゼの還元型基質を含有し、各試薬が測定対象に適した濃度となるように配合された試薬キットとして通常提供される。提供される際の試薬の形態は、乾燥状、液状など特に限定されるものではない。試薬キット中には、酵素の活性化剤などが配合されていてもよく、また試薬キットが、例えば第一反応用試薬と第二反応用試薬との組合せのように、反応液中に添加する時期が異なる複数の種類の試薬を組み合わせたものであってもよい。

【0026】

【発明の効果】本発明により、検体中に存在するコレステロール量自体が微量な場合、または検体量自体がごく少量の場合であっても、コレステロールを正確に定量できるようになり、臨床検査や食品検査の分野での有用性が高い。

【0027】

【実施例】本発明をより詳細に説明するために実施例及び比較例を挙げるが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

【0028】〔実施例1〕以下の試薬を調製した。

【0029】

※【0031】〔比較例1〕実施例1の試薬からグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ及びグルコース-6-リン酸二ナトリウムを除き、実施例1と同様に操作して、コレステロール濃度に対する吸光度をプロットした。その結果を図2に示す。

【0032】比較例1の試薬組成のサイクリング反応では、効率の良いサイクリング反応が進行しないことが分かった。

【0033】一方、実施例1の試薬組成では、第二のデヒドロゲナーゼ及び第二のデヒドロゲナーゼの基質とし

て、それぞれグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ及びグルコース-6-リン酸二ナトリウムが添加されているので、サイクリング効率が上昇し、生成する過酸化水素量が増え、感度が上がることが分かった。さらに、*

試薬A

緩衝剤	50 mmol/L
β -NADH	40 μ mol/L
トリトンX-100	0.3%
TOOS	2.0 mmol/L
POD	4 U/mL
グルコース-6-リン酸	4 mmol/L
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	4 U/mL
コレステロールエステラーゼ	4 U/mL
pH	7.5

【0036】試薬B

緩衝剤	50 mmol/L
コレステロールオキシダーゼ	8 U/mL
CDH	16 U/mL
トリトンX-100	0.3%
4-アミノアンチピリン	4 mmol/L
pH	7.5

【0037】ヒト血清を生理食塩水で希釈し、約50、40、30、20、10、5、2.5、1.25、0.63、0.31のコレステロールを含有する各検体を調製した。

【0038】試薬A 288 μ Lに検体10 μ Lを加え37℃で5分間反応させた後、試薬B 72 μ Lを加え37℃で5分間反応させ、試薬ブランクを対照に波長546 nmの吸光度を測定した。

【0039】比較対照試薬として、特開平8-70894号公報の〔実施例〕に記載の試薬5及び試薬4を調製し、〔実施例-4〕に記載の方法に従い操作した。なお、各操作法における反応液中のコレステロール濃度を同じにするために、試薬容量/検体容量の比を36/1とした。その結果を図3（本法）及び図4（特開平8-70894号公報の方法、以下、「従来法」ともいう。）に示す。

試薬A

緩衝剤	50 mmol/L
β -NADH	40 μ mol/L
トリトンX-100	0.3%
TOOS	2.0 mmol/L
POD	4 U/mL
ホルムアルデヒド	5 mmol/L
ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ	2 U/mL
コレステロールエステラーゼ	4 U/mL
pH	7.5

【0045】試薬B

★50★緩衝剤

*使用する補酵素の濃度を調整することにより、より高感度な測定が可能になることが分かった。

【0034】〔実施例2〕以下の試薬を調製した。

【0035】

※【0040】また、約1.25 mg/dLのコレステロール濃度の検体について10回測定したときの平均値、標準偏差、変動係数を求め、表1にまとめた。

【0041】図3及び図4に示されるように、本発明方法によれば、従来法の感度を5分間の吸光度変化量に換算しても同等以上の感度を有することから、高感度にコレステロールを測定することが明らかである。また表1に示されるように、約1.25 mg/dLのコレステロールを測定するとき、従来法と同等以上の良好な再現性を示した。

【0042】

【表1】

試 薬	従来方法	本発明方法
平均値 (mg/dL)	1.27	1.24
標準偏差 (mg/dL)	0.019	0.011
変動係数 (%)	1.5	0.8

【0043】〔実施例3〕以下の試薬を調製した。

【0044】

50 mmol/L

コレステロールオキシダーゼ 8 U/ml
 CDH 16 U/ml
 トリトンX-100 0.3%
 4-アミノアンチピリン 4 mmol/L
 pH 7.5
 【0046】生理食塩水で100倍希釈したヒト血清10例を検体として、実施例2の操作方法によりコレステロール濃度を測定した。また、希釈をしない検体を国際*

* 試薬株式会社製のT-CHO試薬・K「コクサイ」で測定した。結果を表2に示した。

【0047】100倍希釈検体を測定した本法と、すでに臨床検査に適用されているT-CHO試薬・K「コクサイ」による方法とは極めて良い相関性を示した。これは本法が高感度に測定できることを示すものである。

【0048】

【表2】

試 薬	T-CHO試薬・ K「コクサイ」	本発明方法
ヒト血清-1	198	1.94
2	273	2.69
3	209	1.94
4	295	2.85
5	191	1.89
6	91	0.90
7	145	1.41
8	238	2.37
9	252	2.51
10	142	1.50

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のコレステロール濃度に対する吸光度を示す図である。

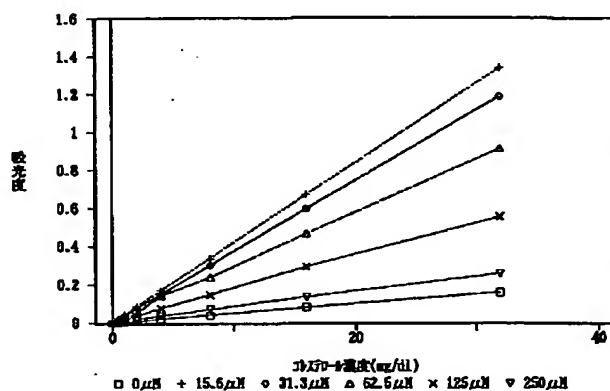
【図2】比較例1のコレステロール濃度に対する吸光度を示す図である。

※【図3】実施例2の本法におけるコレステロール濃度に対する吸光度を示す図である。

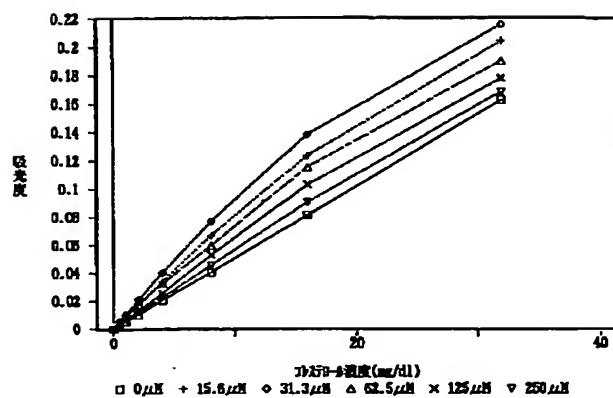
【図4】実施例2の従来法におけるコレステロール濃度に対する吸光度変化量を示す図である。

※

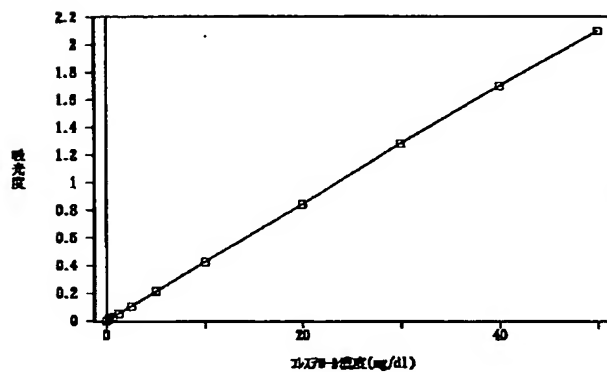
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

